

第12回 胚細胞呼吸測定装置研究会(第6回厚生労働省班会議)が平成26年6月14日(土)福島ビューホテルで開催されました。共同研究施設やパナソニック社、クリノ社、そして実際に臨床現場で使用する胚培養士からも意見を出し合い、胚呼吸測定装置と治具の試作品に改良を重ね、より使いやすいものにするため詳細なディスカッションが行われました。薬事承認が必須でなくなったため、研究、臨床応用へのハードルが低くなった一方、アニマルモデルでの臨床前実験も必要ではないか、という意見が出るなど、活発な意見交換がなされました。東北大学において倫理委員会の承認が得られ、今年度はヒト余剰卵を用いた研究も開始となります。この臨床研究により胚細胞呼吸測定装置が胚細胞の新たな客観的評価法となり、不妊症で悩まれている患者様にとって大きな福音となるよう、引き続き東北一丸となって研究を進めていきます。次回開催は9月に金沢です。



(資料 15)

第13回 胚細胞呼吸測定装置研究会

(第7回 厚生労働省班会議)

日時：平成26年9月28日(日) 8:00~9:00

場所：ホテル金沢 エメラルドB(4階)

プログラム

進行 東北大学 宇都宮 裕貴

① 開会の辞

東北大学 八重樫 伸生

② 試作機器の開発状況

パナソニックヘルスケア社

③ 第1回予備実験の結果報告

東北大学 黒澤 大樹

④ 事務連絡

東北大学 志賀 尚美

1) 対象症例の同意取得状況

2) 今後の各協力施設での倫理申請について

3) 今後の予定について

ヒト余剰卵を用いた臨床研究、学会報告の予定など

⑤ 各施設における進捗報告

各施設担当者

⑥ 閉会の辞

秋田大学 寺田 幸弘

第13回胚細胞呼吸測定装置研究会(第7回厚生労働省班会議)が平成26年9月28日(日)ホテル金沢で開催されました。パナソニックヘルスケア社より試作機器の開発状況、東北大学よりヒト余剰卵を用いた第1回予備実験の結果、対象症例の同意取得状況、各協力施設での倫理申請について、今後の予定(臨床研究、学会報告など)について報告がなされました。予備実験の報告について、プレート内に生じる気泡等の問題、測定条件、測定結果について活発なディスカッションが行われました。また、インキュベータに胚細胞呼吸測定装置とタイムラプス装置を組み込んでみてはよいのではないか、胚細胞呼吸測定を行った後にミトコンドリア、胚盤胞の細胞数について観察すると新しい知見が得られるのではないかなど、たくさんのアイディアが出されました。今後、10月、12月と予備実験が行われ、年明けからはいよいよヒト余剰卵を用いた本実験が始まります。今年は厚労科研のしめくくりの年であり、実用化に向け結果を出せるよう、東北一丸となって研究を進めていきます。次回開催は来年3月に仙台です。



(資料 16)

第14回 胚細胞呼吸測定装置研究会

(厚生労働省医療機器開発推進研究事業 班会議)

日時：平成27年3月1日(日) 9:00～11:00

場所：江陽グランドホテル3階 羽衣の間

プログラム

進行 東北大学 宇都宮 裕貴

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 1・開会の辞 | 東北大学 八重樫 伸生 |
| 2・試作機器の開発状況 | パナソニック(ヘルスケア、AIS社) |
| 3・研究結果報告 | 東北大学 志賀 尚美 |
| 4・本研究会今後の方向性 | 東北大学 宇都宮 裕貴 |
| 1) 倫理申請、余剰卵蓄積について | |
| 2) 研究報告書記載について | |
| 3) 来年度の研究計画 | |
| 5・各施設における進捗報告 | 各施設担当者 |
| 6・閉会の辞 | 山形大学 阿部 宏之 |

14 回胚細胞呼吸測定装置研究会(厚生労働省医療機器開発推進研究事業 班会議)が平成27年3月1日(日)江陽グランドホテルで開催されました。パナソニックヘルスケア社より機器開発の進捗状況と機器の展示・説明があり、東北大学より51個のヒト余剰卵を用いた計4回の実験果報告と検討課題、本研究会の今後の方向性について報告がなされました。データの解析方法の工夫、胚のサイズや形状と測定値についての関連、測定値と形態学的クオリティ・生産率の相関性についての基礎的な検討の必要性など、活発なディスカッションが行われました。

3月で今回の厚労科研のしめくりとなり、研究も大詰めですが、実用化に向けさらなる機器の改良と、データの蓄積が必要と考えられます。不妊で悩むカップルの福音となるよう、また2018年仙台で開催される日本産婦人科学会学術集会での機器発表を目指して、来年度以降も東北一丸となって研究を進めていきたいと思ひます。



Ⅱ. 分担研究報告書

1. 凍結融解が胚盤胞の呼吸活性に与える影響と 再凍結融解胚を用いたIVF-ETの臨床結果に関する研究

平成24年度～26年度

分担研究者 寺田幸弘(秋田大学医学部教授)

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業） 分担研究報告書

凍結融解が胚盤胞の呼吸活性に与える影響と 再凍結融解胚を用いた IVF-ET の臨床結果に関する研究

研究分担者 寺田 幸弘 秋田大学教授

研究要旨

受精卵の凍結技術はガラス化凍結法の開発により、その保存の信頼性に加え簡便性も大きく向上した。一般診療において、余剰胚が生じた場合あるいは卵巣過剰刺激症候群時や移植の際の子宮内膜の菲薄化所見時などの医学的適応により、胚盤胞での凍結を行っている。さらに、複数個の胚盤胞を融解した場合や、不測の事態により移植がキャンセルになった場合には、胚盤胞の再凍結を行っている。しかし、再凍結融解胚を用いた周期での妊娠出産例の報告はあるものの、この方法が胚に生物学的に与える影響についての検討はなされていない。我々は、再凍結、再融解が胚盤胞の呼吸量に与える影響の検討結果と、再凍結再融解した胚盤胞の移植を実施した症例の臨床結果について検討を行った。

実験方法としては以下の2つを行った。(1) 胚呼吸量：凍結融解胚を数時間回復培養にかけた後、現行の受精卵呼吸測定装置 (CRAS1.0) を用いて測定した。測定後再凍結し、後日1回目と同様に再融解し、2回目の呼吸量を測定し、1回目の呼吸量との変化を比較した。(2) 移植症例：呼吸量を測定した胚とは別に、当科で凍結融解後、再凍結再融解し移植した9例を対象とした。凍結融解胚移植の際使用しなかった胚盤胞を再凍結し、次の移植可能周期に再融解した。融解後、超音波ガイド下に胚移植を実施した。なお、妊娠の診断は、超音波診断により子宮内に胎嚢が確認できた症例とした。

本研究の結果、再凍結融解した胚盤胞の呼吸量は、Gardner 分類において低グレードの胚が高グレードの胚よりも呼吸量値が低くなる傾向がみられた。また低グレードの胚では呼吸量が低くなり、再融解に耐えられない胚も存在した。これとは別に、再凍結融解胚盤胞を移植した結果、9例中2例に胎嚢が確認された。2例中1例は妊娠継続中であり、他の1例は妊娠37週で帝王切開により3,200gの男児を出産した。母児ともに健康であり、出生児に異常はみられなかった。

本検討から、高グレードの胚盤胞では、凍結融解を繰り返すことによる呼吸量活性へ影響を与えないことが示唆された。比較して、低グレードの胚盤胞では、再凍結融解によって呼吸量活性が大きく影響を受けていた。また、再凍結融解胚を移植した結果から、再凍結融解を行ってもグレードが上昇するような高品質胚では妊娠可能であることが示された。以上より、呼吸量活性が胚の質的評価に有用である可能性が示唆された。従来のGardner分類に胚呼吸量活性を組み入れた新たな評価手法を確立することで、生殖補助医療の質的向上に資することが期待される。

研究協力者

熊谷仁(秋田大学産婦人科准教授)
熊澤由紀代(秋田大学産婦人科助教)
佐藤亘(秋田大学産婦人科助教)
金森恭子(秋田大学産婦人科医員)
白澤弘光(秋田大学産婦人科医員)
富樫嘉津恵(秋田大学産婦人科医員)
佐藤恵美子(秋田大学産婦人科胚培養士)
栂嶋克哉(秋田大学産婦人科胚培養士)

A・研究目的

受精卵の凍結技術はガラス化凍結法の開発により、その保存の信頼性に加え簡便性も大きく進化した。一般診療において余剰胚が生じた場合、あるいは卵巣過剰刺激症候群の場合、また移植の際の子宮内膜の菲薄化所見時などの医学的適応により、胚盤胞での凍結が行われている。さらに、複数個の胚盤胞を融解した場合や、不測の事態により移植がキャンセルになった場合には、胚盤胞の再凍結が行われている。さらに、日本産科婦人科学会の主導による着床前受精卵遺伝子スクリーニング(PGS)の臨床研究の結果、将来的にPGSの実施が認められると、凍結胚をPGS後に再凍結する必要性が生じる事態も予測される。しかし、再凍結融解胚を用いた周期での妊娠出産例の報告はあるものの、この方法が胚に生物学的に与える影響に関しての検討はなされていない。獲得された複数の受精卵は、従来は形態学的評価のみで評価を行ってきたが、主観性が強く観察者間での結果に差が生じる可能性が高い(1, 2)。これまでに受精卵の呼吸機能と卵品質が相関することに着目し、その有用性が報告されている(3-8)。さらに、この手法は非常に高感度である上に侵襲もないと考えられている。

今回、細胞呼吸測定機器(製品名CRAS1.0)を用いて、再凍結・再融解が胚盤胞の胚呼吸活性に与える影響を検討した。さらにこれとは別に、再凍結再融解した胚盤胞の移植を実施した症例の臨床結果についても検討を行ったので報告する。

B・研究方法

1) 胚呼吸量: 胚呼吸量の検討については、凍結保存中の胚のうち、今後、治療に用いる予定がない余剰胚を用いた。凍結融解胚を数時間回復培養にかけた後、現行の受精卵呼吸測定装置(製品名CRAS1.0)を用いて測定した。測定後再凍結し、後日1回目と同様に再融解し、2回目の呼吸量を測定し、1回目の呼吸量との変化を比較した。また、凍結融解を5回まで延長して繰り返し行い、形態的な変化を追跡した。この際、凍結融解は北里バイオファルマ社のCryotop Safety Kitを用い、プロトコールに従って行った。

2) 移植症例: 呼吸量を測定した胚とは別に、平成24年1月より平成24年12月および平成26年1月より平成26年12月の間に当科で凍結融解後、再凍結再融解し移植した9例を対象とした。凍結融解胚移植の際使用しなかった胚盤胞期胚を再凍結し、次の移植可能周期に再融解した。融解後、超音波ガイド下に胚移植を実施した。なお、妊娠の診断は、超音波診断により子宮内に胎嚢が確認できた症例とした。出生児の調査は、日本産科婦人科学会のART登録データにおける当科の登録データを用いた。

(倫理面への配慮)

ヒト余剰胚を用いた呼吸量測定については、学内倫理委員会の承認を取得している。さらに、新型受精卵呼吸測定装置を用いた臨床研究を学内倫理委員会に申請している。

C・研究結果

一般に受精卵の形態学的評価はGardnerやVeeckらの分類(図1)に基づいて行うが、今回使用した再凍結融解した胚盤胞の胚呼吸量は、低グレードの胚では高グレードの胚よりも呼吸量値が低くなる傾向が見られた。また低グレードの胚では呼吸量が低くなり、再融解に耐えられない胚も存在した(表1)。凍結融解を5回まで繰り返したところ、6個中4個の胚盤胞は5回の凍結融解後も生存することが可能であった(図2、3)。残り2個の胚盤胞は凍結融解を繰り返す途上で変性したが、これらの胚盤胞は採卵時の年齢が30代後半と高く、発育速度が遅い(受精後6日目)胚である傾向がうかがわれた。

これらとは別に、再凍結融解胚盤胞を移植した結果、9例中2例に胎嚢が確認された(表2)。2例中1例は妊娠継続中であり、他の1例は妊娠37週で帝王切開により3,200gの男児を出産した。母児ともに健康であり、出生児に異常はみられなかった。

D・考察

本検討の結果から、高グレードの胚盤胞では、凍結融解を繰り返すことによる呼吸量活性へ影響を与えないことが示唆された。比較して、低グレードの胚盤胞期胚では、再凍結融解によって呼吸量活性が大きく影響を受けていた。しかしながら、現行の受精卵呼吸測定装置は正確な測定のための手技習得に多大な時間を要するため、安定的な結果を得ることが困難な面もみられた。新型受精卵呼吸測定装置は操作性の問題が解決されており、再現性の高い測定結果が得られることが期待される。

E・結論

受精卵呼吸測定装置を用いた受精卵の品質評価法は、非常に高感度である上に侵襲もない画期的な装置であると考えている。そのため、従来の主観的な形態学的評価に受精卵呼吸測定装置を用いた客観的な機能評価を加えることにより、優良卵の選別が可能になると考えている。そして、早期妊娠成立や不要な胚移植による医療費の削減が可能となると期待している。

F. 研究発表

1. 論文発表

Peer review誌に投稿中

2. 学会発表

(1)黒澤大樹¹、宇都宮裕貴¹、志賀尚美¹、寺田幸弘⁵、高橋俊文⁴、福井淳史³、菅沼良太²、八重樫伸生¹：¹東北大学医学部産科学婦人科学教室²福島県立医科大学産科婦人科学講座³弘前大学医学部産科婦人科学教室⁴山形大学産科婦人科学講座⁵山形大学山形大学大学院理工学研究科⁶秋田大学大学院医学系研究科医学専攻 機能展開医学系 産婦人科学講座：測定の自動化を可能としたチップ型受精卵呼吸測定装置の有用性について 第62回北日本産科婦人科学会、金沢

(2)黒澤大樹¹、宇都宮裕貴¹、高橋藍子¹、渡邊善¹、志賀尚美¹、熊谷仁²、寺田幸弘²、五十嵐秀樹³、高橋俊文³、阿部宏之⁴、福井淳史⁵、菅沼亮太⁶、八重樫伸生¹：¹東北大学医学部産婦人科学、²秋田大学院医学部産婦人科、³山形大学医学部産婦人科、⁴山形大学大学院理工学研究科、⁵弘前大学医学部産婦人科、⁶福島県立医科大学産婦人科：チップ型受精卵呼吸測定装置によるヒト余剰卵の呼吸活性の検討 第52回東北生殖医学会、秋田

(3)志賀尚美¹、宇都宮裕貴¹、高橋藍子¹、石橋ますみ¹、黒澤大樹¹、渡邊善¹、菅沼亮太²、福井淳史³、高橋俊文⁴、阿部宏之⁵、寺田幸弘⁶、八重樫伸生¹：¹東北大学医学部産科学婦人科学教室²福島県立医科大学

産科婦人科学講座³ 弘前大学医学部産科婦人科学教室⁴ 山形大学産科婦人科学講座⁵ 山形大学山形大学大学院理工学研究科⁶ 秋田大学大学院医学系研究科医学専攻 機能展開医学系 産婦人科学講座: 新規チップ型受精卵呼吸測定装置を用いた受精卵の客観的評価法の検討 第59回生殖医学会、東京

G・知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

(参考文献)

- (1) Mio Y and Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol.* 199:660.e1-5. 2008
- (2) Okutsu O. Human embryo grading. *J Mamm Ova Res.* 25:90-7. 2008
Yamanaka M, Abe H, et al. Prediction for developmental competence of human blastocyst based on its oxygen consumption. *Fertil Steril.* 26:3366-71. 2011
- (4) Yamanaka M, Abe H, et al. Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. *Hum Reprod.* 26:3366-71. 2011
- (5) Date Y, Abe H, et al. Monitoring oxygen consumption of single mouse embryos using an integrated electrochemical microdevice.

Biosens Bioelectron. 15;30:100-6. 2011

- (6) Moriyasu S, et al. Relationship between the respiratory activity and the pregnancy rate of bisected bovine. *Reprod Fertil Dev.* 19:219. 2007
- (7) Abe H. A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *J Mamm Ova Res.* 24:70-8. 2007
- (8) Utsunomiya T, Abe H, et al. Evaluating the quality of human embryos with a measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *J Mamm Ova Res.* 25:2-7. 2008

表 1

呼吸量

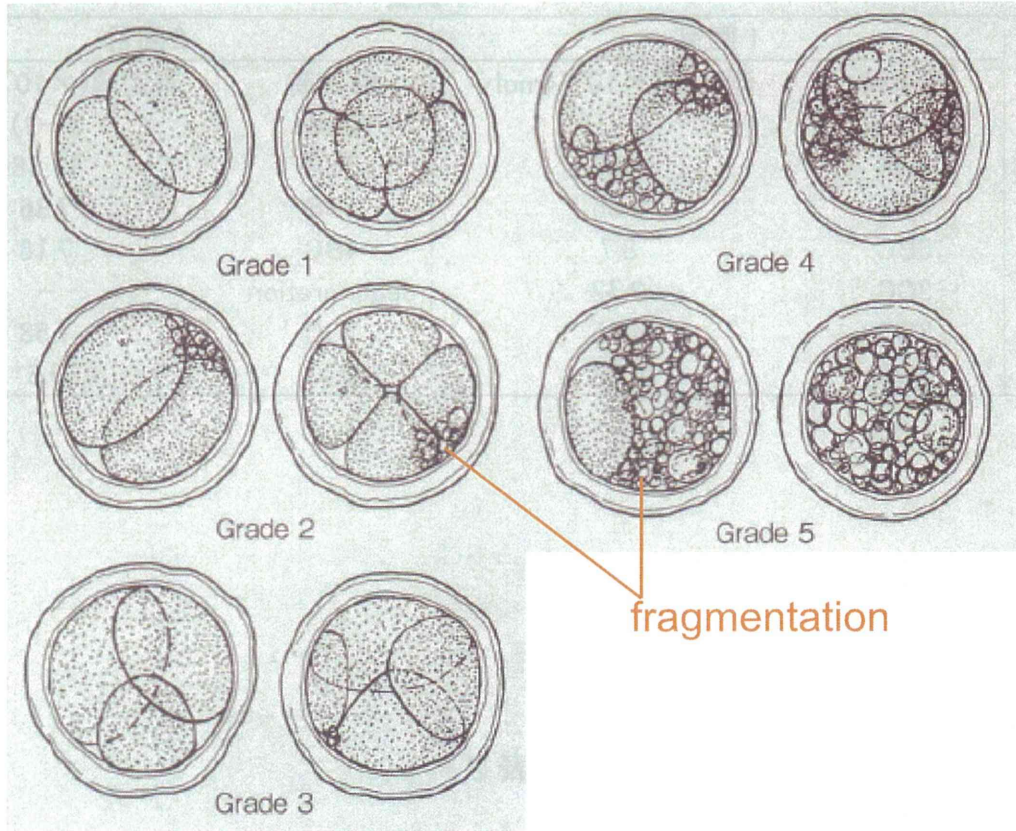
sample No.	1 回目		2 回目	
	解凍時 Grade	測定値($\times 10^{14}\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$)	解凍時 Grade	測定値($\times 10^{14}\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$)
1	5BA	10.7	5BA	11.38
2	4BB	8.85	4BB	7.86
3	3BC	8.7	4BC	7.16
4	3CC	2.72	degeneration	-
5	3CC	4.85	3CC	1.58
6	3CC	6.82	3CC	9.6

表 2

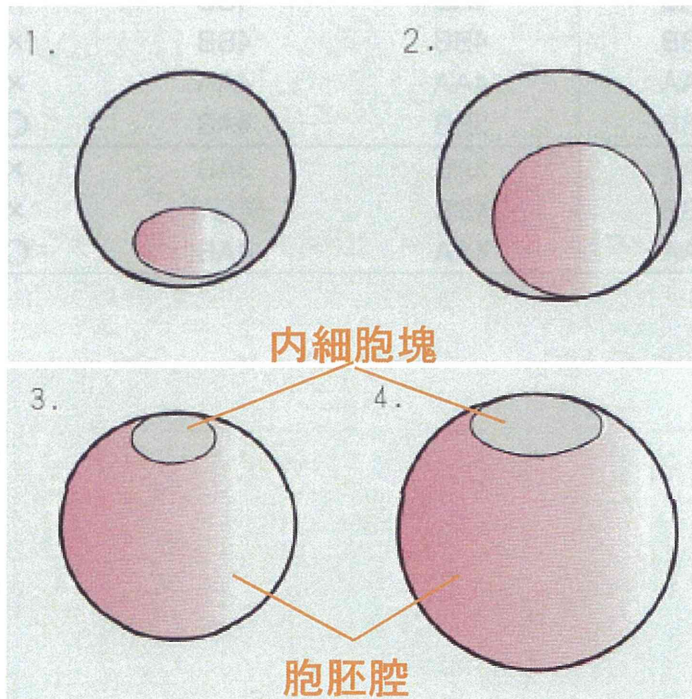
No	凍結胚 grade	融解時 grade	再凍結時 grade	再融解時 grade	転帰
1	4AA	4AA	4AA	4BB	×
2	4BB	4BB	4BB	4BC	×
3	4AA	4AB	4AB	4BB	×
4	2	4BB	4BB	4BB	×
5	3AA	4AA	4AA	4AA	×
6	3BB	3BB	3BB	4AB	○
7	3AB	3AB	3AB	3AB	×
8	4BB	4BB	4BB	戻らず	×
9	4AA	4AA	4AA	4AB	○

図1

Veeck分類



Gardner分類



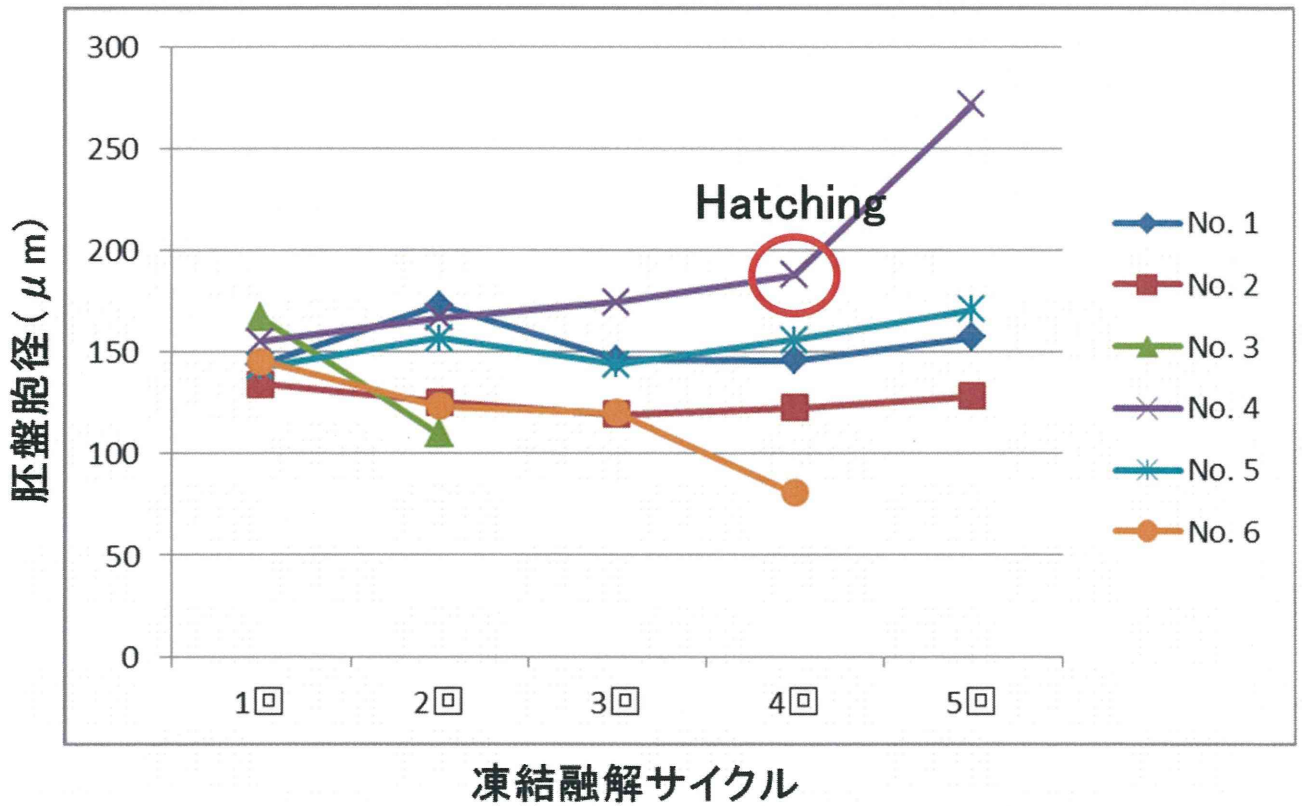


図2. 複数回凍結融解したヒト胚盤胞における径の変化

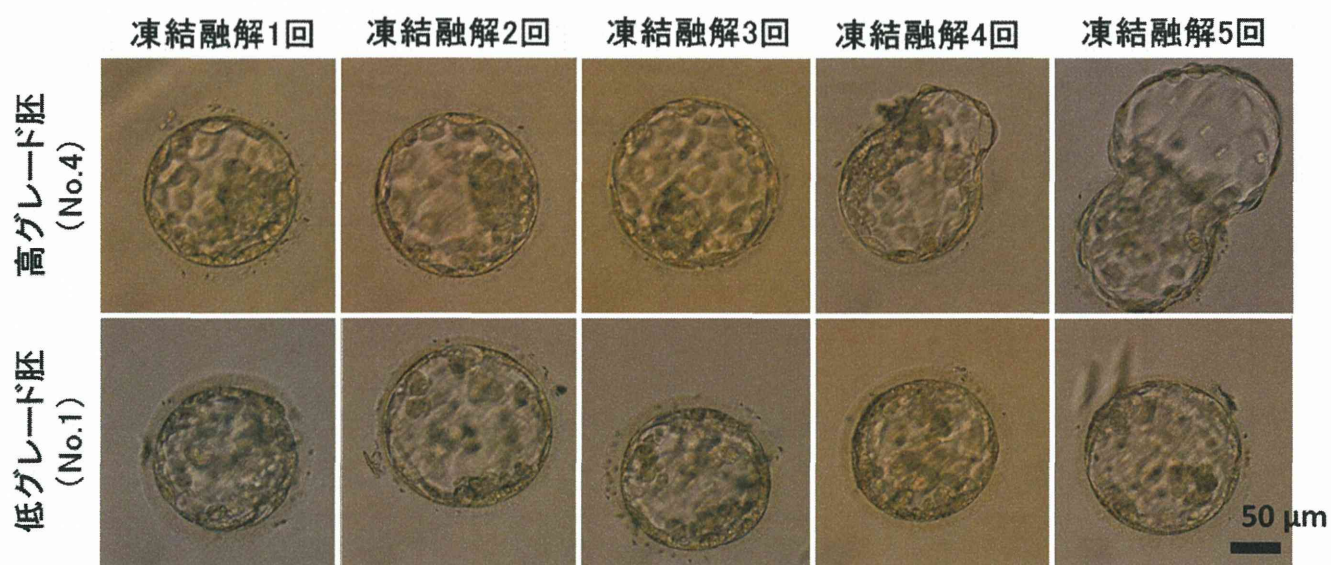
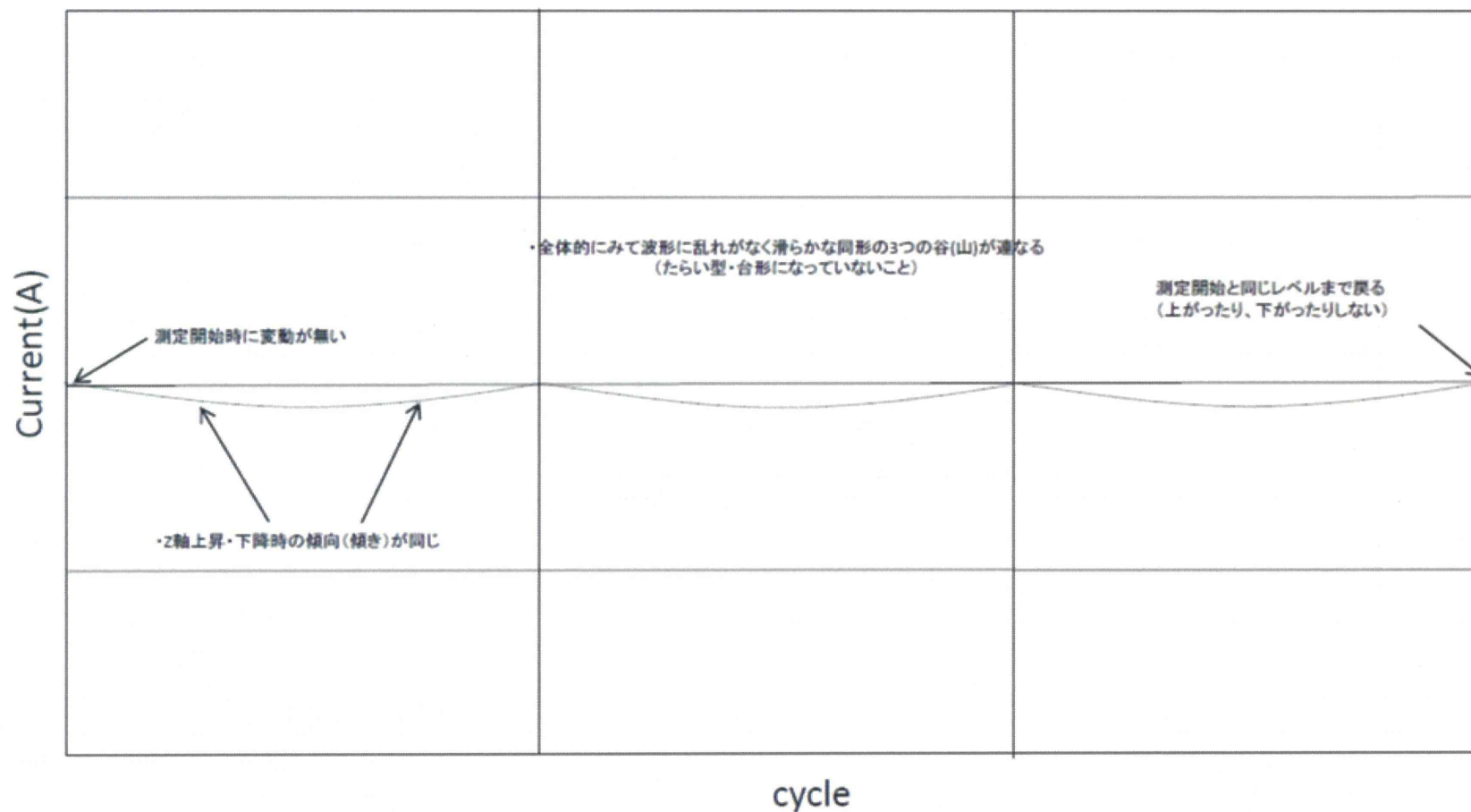


図3. 複数回凍結融解したヒト胚盤胞における形態の変化

・呼吸活性が高い胚を測定した場合の理想的な波形

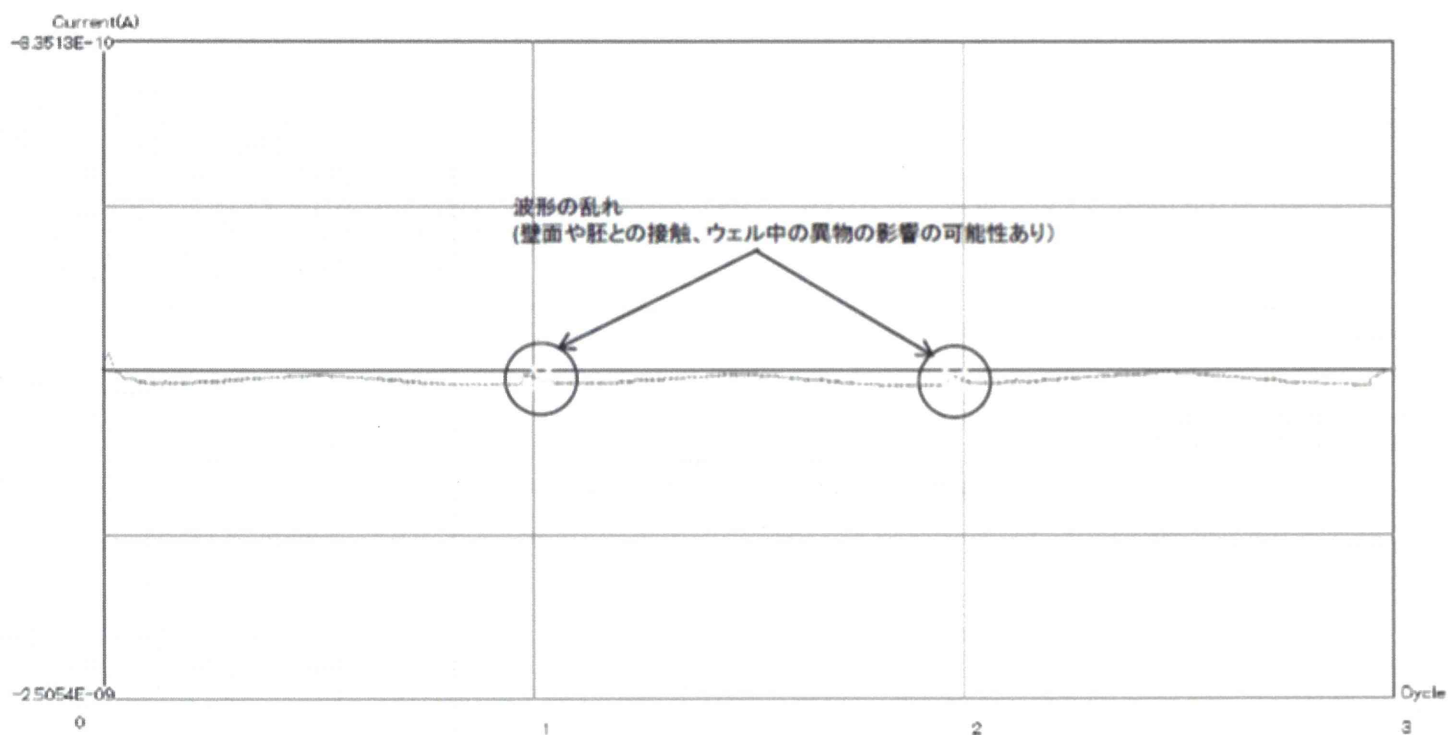
(ブランク測定時・活性が低い胚などの測定時は、測定液の状態によっては上向きの山になる場合もあり)



※あくまで理想形です。上記を満たさなくとも許容できるものもありますので、不明な場合はデータを御送りいただければ確認させていただきます。

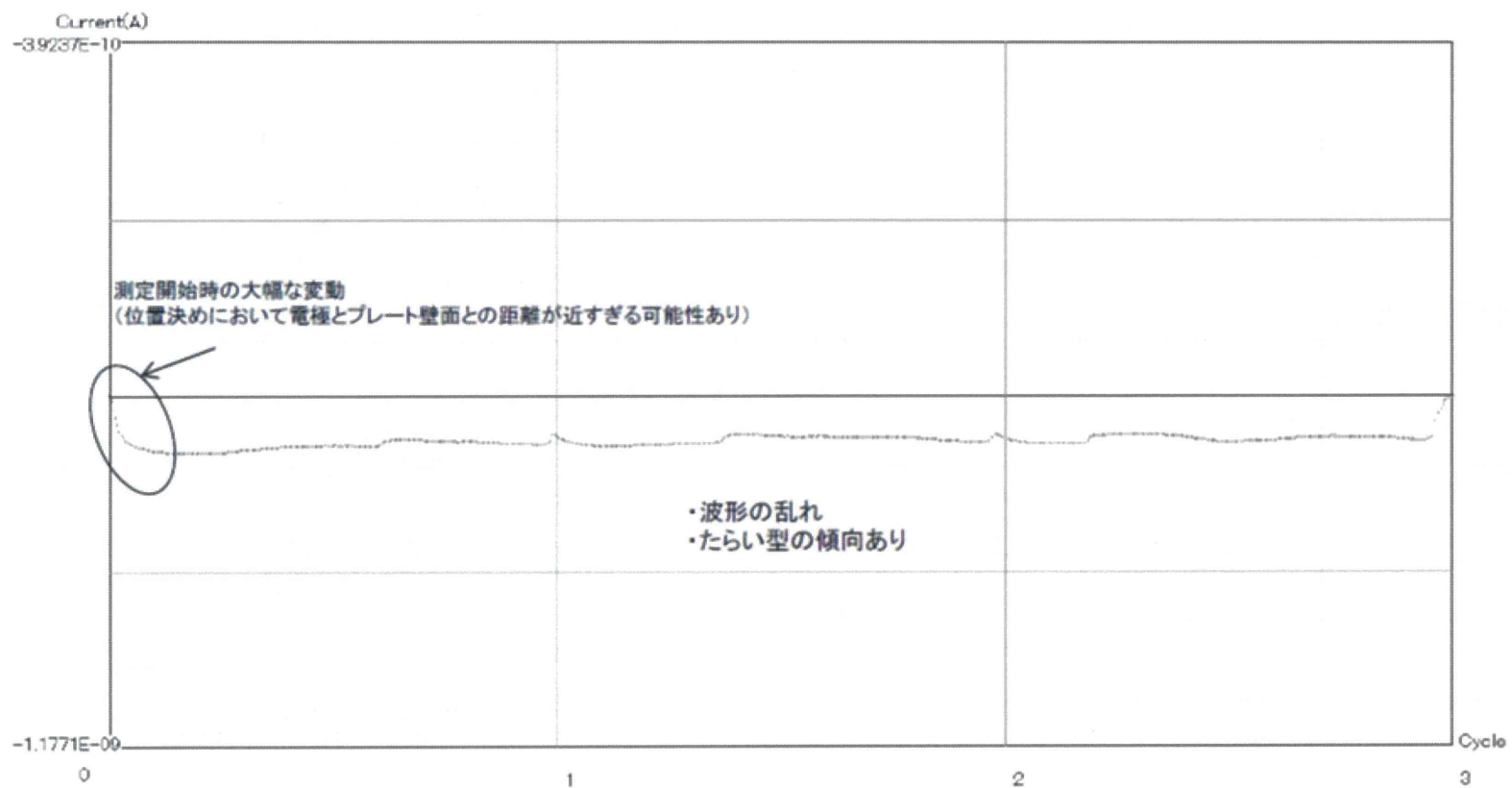
・測定不良例 1

sample3_2times_1



・測定不良例 2

sample5_2times_3



・測定不良例 3

sample11_2times_1

